**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Лейцин** |  | **ФС** |
| **Лейцин** |  |  |
| **Leucinum** |  | **Взамен ВФС 42-597-92** |

|  |
| --- |
|  |
| (2*S*)-2-Амино-4-метилпентановая кислота |
|  |
| C6H13NO2 | М.м. 131,17  |

Субстанция представляет собой продукт ферментации или белкового гидролиза.

Cодержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % лейцина C6H13NO2 в пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический порошок или блестящие хлопья.

**Растворимость.** Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %. Растворяется в разведенных растворах минеральных кислот и щелочей.

**Подлинность**

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»).Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца лейцина.

 *2. ТСХ* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Уксусная кислота ледяная—вода—бутанол 20:20:60.

*Испытуемый раствор.*В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг субстанции, растворяют в хлористоводородной кислоте 1 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца лейцина.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг стандартного образца лейцина, растворяют в хлористоводородной кислоте 1 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (1 мкг) и раствора стандартного образца лейцина (1 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 75 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают нингидрина раствором 0,2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 15 мин и просматривают в дневном свете.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца лейцина.

**Удельное вращение.** От +14,5 до +16,5 в пересчете на сухое вещество (4 % раствор субстанции в хлористоводородной кислоте 25 %, ОФС «Поляриметрия»).

**Прозрачность раствора.** Раствор субстанции 5 % в хлористоводородной кислоте разведенной 10 % должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном BY6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН.** От 5,5 до 7,0 (1 % раствор субстанции, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ионообменной хроматографии с пост-колоночной дериватизацией с нингидрином (ОФС «Аминокислотный анализ», анализ по методу 1).

*Растворитель.* Хлористоводородная кислота разведённая 0,037 %.

*Испытуемый раствор А.* Около 30 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Испытуемый раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора А и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор примеси А.* Около 10 мг (точная навеска) примеси А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор L-пролина.* Около 10 мг (точная навеска) L-пролина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг примеси А и 5 мг L-лейцина, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 6,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Холостой раствор.* Растворитель.

Примечание

Примесь А (L-изолейцин): (2*S*,3*S*)-2-амино-3-метилпентановая кислота, CAS 73-32-5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 440 и 570 нм. |

Остальные условия устанавливают в соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора.

Хроматографируют эквивалентные объёмы холостого раствора, раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствора L-пролина, раствора примеси А, раствора сравнения, испытуемого раствора Б и испытуемого раствора А.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси А и L-лейцина должно быть не менее 1,5.

Содержание примеси А, обнаруживаемой при длине волны 570 нм, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙50∙25∙1∙3}{S\_{0}∙a\_{1}∙1∙100∙250∙10}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙0,015}{S\_{0}∙a\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси А на хроматограмме испытуемого раствора Б; |
|  | *S*0 | − | площадь пика примеси А на хроматограмме раствора примеси А; |
|  | *a*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска примеси А, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в примеси А, %.  |

Содержание любой другой примеси, обнаруживаемой при длине волны 570 нм, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙50∙1∙2∙100}{S\_{0}∙50∙100∙10}=\frac{S\_{1}}{S\_{0}∙5}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора А; |
|  | *S*0 | − | площадь пика лейцина на хроматограмме раствора сравнения. |

Содержание любой другой примеси, обнаруживаемой при длине волны 440 нм, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙50∙3}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙250}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙0,006}{S\_{0}∙a\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора А; |
|  | *S*0 | − | площадь пика L-пролина на хроматограмме раствора L-пролина; |
|  | *a*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска L-пролина, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в L-пролине, %.  |

Если примесь превышает порог игнорирования при обоих длинах волн, ее рассчитывают при длине волны 570 нм.

*Допустимое содержание примесей:*

- примесь А − не более 0,8 %;

- любая другая примесь − не более 0,2 %;

- сумма примесей − не более 1,0 %;

Не учитывают пики менее 0,05 %.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1 г (точная навеска) субстанции.

**Аммоний.** Определение проводят методом методом ионообменной хроматографии с пост-колоночной дериватизацией с нингидрином в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменения.

*Раствор аммония хлорида.* Около 0,741 г (точная навеска) аммония хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 10,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют сразу после приготовления.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 6,0 мл раствора аммония хлорида и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 570 нм. |

Хроматографируют эквивалентные объёмы холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора А.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора А площадь пика аммония не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора (не более 0,02 %).

**Железо.** Не более 0,001 % (ОФС «Железо», метод 2).

*Испытуемый раствор.* Около 1 г (точная навеска) субстанции помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, экстрагируют тремя порциями метилизобутилкетона по 10 мл, каждый раз встряхивая в течение 3 мин, объединяют органические извлечения, прибавляют 10 мл воды и встряхивают в течение 3 мин. Используют водный слой.

**Сульфаты.** Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). Для определения используют 15 мл испытуемого раствора и 15 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

*Испытуемый раствор.* Растворяют 0,5 г субстанции в 3 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % и доводят объем раствора водой до 15 мл.

**Хлориды.** Не более0,02 % (1 % раствор субстанции, ОФС «Хлориды»).

**Сульфатная зола.** Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжелые металлы.** Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 1, в зольном остатке, полученном после сжигания 1 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 3 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 30 мл уксусной кислоты безводной и титруют 0,1 Мраствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»).

1 мл 0,1М раствора хлорной кислоты соответствует 13,12 мг лейцина C6H13NO2.

**Хранение.** В защищённом от света месте.